

2P-201 Cre 組み込み型レトロウイルスベクターによる配列特異的遺伝子導入

○今西 傑, 下村 卓矢, 河邊 佳典, 井藤 彰, 上平 正道
(九大院・工・化工)
kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

【背景と目的】レトロウイルスベクターは、目的遺伝子を効率よく宿主ゲノム上に組み込むことができる遺伝子導入法であるが、導入遺伝子のゲノムへの組み込み位置が制御できない。本研究ではインテグラーゼ (IN) 欠損型レトロウイルスベクター (IDRV) 内に Cre タンパク質を組み込んだ Cre 組み込み型 IDRV (Cre-IDRV) を作製し、Cre/loxP システムに基づいたゲノム上の特定部位への遺伝子導入を試みた。

【方法】IN 遺伝子内で点変異導入 (D184A) をさせた pGag-polM (pGPM) を構築した。続いて Gag 遺伝子内に Cre 遺伝子を遺伝子工学的に融合させた pGPM-Cre を作製した。これらプラスミドと、目的遺伝子 (Neo/IRES/GFP) の両端に loxP を挟んだレトロウイルスベクター生産用プラスミドを pVSV-G とともに 293FT 細胞に一過性導入し Cre-IDRV を生産させた。対応する loxP を有するターゲット細胞 (CHO/F17 細胞) に感染させ、薬剤選抜した。耐性コロニー数を計測し GFP 陽性細胞数を測定した。組換え抗体遺伝子導入の際は、抗体生産を ELISA 法で測定した。

【結果および考察】pGPM と pGPM-Cre が等質量比の条件で作製した Cre-IDRV を用いて、CHO/F17 細胞へ感染させたところ、耐性形成コロニー数が最大となり、GFP 陽性細胞数が最大となった。また、抗体遺伝子を Cre-IDRV を用いて導入したところ、細胞株を樹立することができた。形成されたコロニーからクローンを樹立し、ゲノム PCR を行ったところ、配列特異的遺伝子導入が起こったことを示す遺伝子断片の増幅が確認された。組換え抗体遺伝子導入細胞では、導入遺伝子発現によって抗体が生産されていることがわかった。

Site-specific transgene integration using Cre-incorporating IDRVs

○IMANISHI Suguru, SHIMOMURA Takuya, KAWABE Yoshinori, ITO Akira, KAMIHIRA Masamichi
(Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words Site-specific integration, Cre/LoxP system, retrovirus vector

2P-203 大腸菌宿主を用いた IgG1 抗体生産を目指した分子シャペロン共発現の影響検討

○岡 大貴¹, 鬼塚 正義², 大政 健史²
(¹徳島大院・先端技科, ²徳島大院・ソシオ, ³徳島大院・ソシオ)
omasama@bio.tokushima-u.ac.jp

【目的】通常、複雑な高次構造を有する抗体医薬品は動物細胞を用いて生産される。一方で大腸菌を宿主とした全長型の抗体医薬品生産は大きなチャレンジとして近年注目されつつあり、菌体内における抗体ポリペプチドの適切なフォールディング・アセンブリーの実現が克服すべき課題である。本研究では大腸菌宿主を用いた全長型の抗体生産を目的とし、分子シャペロン共発現による IgG1 抗体の可溶性・フォールディングの向上を検討した。

【方法】分子シャペロンとして GroEL, GroES, dnaK, dnaJ, grpE を含むプラスミド pG-KJE8 及びジスルフィド結合形成を促進する DsbC を細胞質内に発現する SHuffle T7 株を検討した。IgG1 発現ベクターにはペリプラズム移行シグナルを付加した。IgG1 抗体発現の評価として SDS-PAGE, ELISA, ゲル濾過クロマトグラフィー分析を行った。

【結果及び考察】pG-KJE8 の導入により抗体ポリペプチドは可溶性成分として発現が促進し、さらに細胞質内 DsbC 発現によりペリプラズムへの移行が促進された。しかしながらペリプラズムから IgG1 抗体を回収しゲル濾過分析を行った所、殆どが可溶性の凝集体であり、凝集抗体は重鎖量に対して軽鎖量が相対的に少ないことが示された。即ち、軽鎖-重鎖間の適切なアセンブリーが実現していないために可溶性の凝集体を形成したと考察され、軽鎖-重鎖間の S-S 結合形成が機能型抗体の形成に必要であると示唆された。

Effects of chaperone co-expression on full-length IgG1 expression in *Escherichia coli*

○Daiki Oka¹, Masayosi Onitsuka², Takesi Omasa²
(¹Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Univ. Tokushima, ²Inst. Technol. Sci., Univ. Tokushima, ³Inst. Technol. Sci., Univ. Tokushima)

Key words *Escherichia coli*, antibody, chaperonin

2P-202 ΦC31 インテグラーゼによる動物細胞誘導発現系

○西島 謙一, 大西 慎太郎, 奥野 雄也, 佐藤 里歩, 金岡 英徳, 飯島 信司
(名大院・工・生物機能)
nishijma@nubio.nagoya-u.ac.jp

近年 Cre/loxP に加え、FLP/FRT や ΦC31/Att などの組換え酵素/組換えターゲット配列を用いた細胞内での遺伝子編集が用いられ始めている。この中でも ΦC31 は、2 種の異なるターゲット配列を認識して組み替えるため反応後の配列は非認識配列となり、原理的に反応は一方のみである点特徴的である。そこで、ΦC31 インテグラーゼ発現ベクターを構築し、in vitro の実験系を用いて ΦC31 の機能を確認した。

eGFP をスタッファーとして持ち、組換えによりヒトエリスロポエチン (hEPO)、DsRed を発現するレポーターベクターを、組換え酵素 ΦC31 インテグラーゼ安定発現細胞にトランスフェクションした。Hirt 法により回収したプラスミドを精製し、大腸菌にトランスフォームした後解析したところ、細胞内で非常に高い効率で組換えが起こることが確認された。次に、組換えにより hEPO 発現が誘導されるレポーターベクターを導入した GP293 に、ΦC31 インテグラーゼを発現するレトロウイルスベクターを感染させた。この結果、ウイルスタイターに応じて eGFP の発現細胞が減少することが確認された。また、培養上清中の hEPO の発現量を EPO レセプター発現 BaF3 細胞を用いたバイオアッセイにより比較した結果、感染 1 日後から hEPO の発現が認められ、その量は 7 日目に至るまで徐々に増大した。これらの結果より、ΦC31 がゲノムに存在する標的配列を効率よく除去可能であることが確認され、バックグラウンドの低い非可逆的誘導発現が可能であることが示唆された。

Irreversible switch of animal cell expression by PhiC31 integrase

○Ken-ichi Nishijima, Shintaro Onishi, Yuya Okuzaki, Riho Sato, Hidenori Kanaoka, Shinji Iijima
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Key words expression system, recombinant production

2P-204 Cell Line Design and Development Using an Integrated Enterprise Data Management and Analysis Suite

Thomas HARTSCH¹, Ludwig MACKO¹, Sebastien RIBRIOUX¹, Julia RETEY¹, Hideki SHIMOHIRO², Masako SHINJOH²,
○Kaori MORIWAKI²
(¹Genedata AG, ²Genedata KK)
kaori.moriwaki@genedata.com

【Objective】Chinese Hamster Ovary (CHO) cells are the industry's premier work horse for bio-pharmaceutical production. Efficient development and process of cell-line is required to;

- ・ Support traditional and rational cell line development
- ・ Analyze SNPs and genotype & phenotype relationship
- ・ Optimize production: glycosylation, medium, apoptosis, contamination, HCP (Host Cell Protein) with an integrated view on gene function & molecular mechanism and experimental data.

【Results】We used Genedata Selector, a biological data management and analysis enterprise suite in one platform, to provide reference genomes by integrating public genome data of mouse, rat, hamster, CHO cell lines, yeast and bacterial strains with public RNASeq data to provide the refined CHO K1 and hamster genomes and to perform comparative genome of 7 CHO cell lines including DG44. We significantly improved the annotation/function from genes, transcripts to proteins, including transcription factor binding sites (TFBS), metabolic and regulatory pathways. Selector also enables scientists to improve recombinant protein production process by detecting apoptosis, contamination and HCP during fermentations with various omics analyses. We will show (1) Degradome of DG44 cell and (2) Cell Growth Optimization examples using plate assay system.

Cell Line Design and Development Using an Integrated Enterprise Data Management and Analysis Suite

Thomas HARTSCH¹, Ludwig MACKO¹, Sebastien RIBRIOUX¹, Julia RETEY¹, Hideki SHIMOHIRO², Masako SHINJOH², ○Kaori MORIWAKI²
(¹Genedata AG, ²Genedata KK)

Key words Next Generation Sequencing, Cell line and Process Development, CHO, Bio-Pharmaceuticals